

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/EP04/012172

International filing date: 28 October 2004 (28.10.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: DE
Number: 103 50 484.2
Filing date: 20 December 2003 (20.12.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 14 February 2005 (14.02.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

EPG - DG 1

01. 02. 2005

(79)

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 103 50 484.2

Anmeldetag: 20. Dezember 2003

Anmelder/Inhaber: Ehrfeld Mikrotechnik AG i. Ins.,
55234 Wendelsheim/DE

Bezeichnung: Verfahren zur Markierung von Proteinen

IPC: B 01 J, A 61 K, B 01 L

Bemerkung: Der Anmeldetag wurde gem. § 35 Abs. 2 Satz 3 PatG
i.d.F. vom 29. Januar 2003 auf den 20. Dezember
2003 festgesetzt

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung, von denen die Beschreibung und die Patentansprüche am 29. Oktober 2003 und die Zeichnungen am 20. Dezember 2003 eingegangen sind.

München, den 25. Januar 2005
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

~~3~~

5 Verfahren zur Markierung von Proteinen

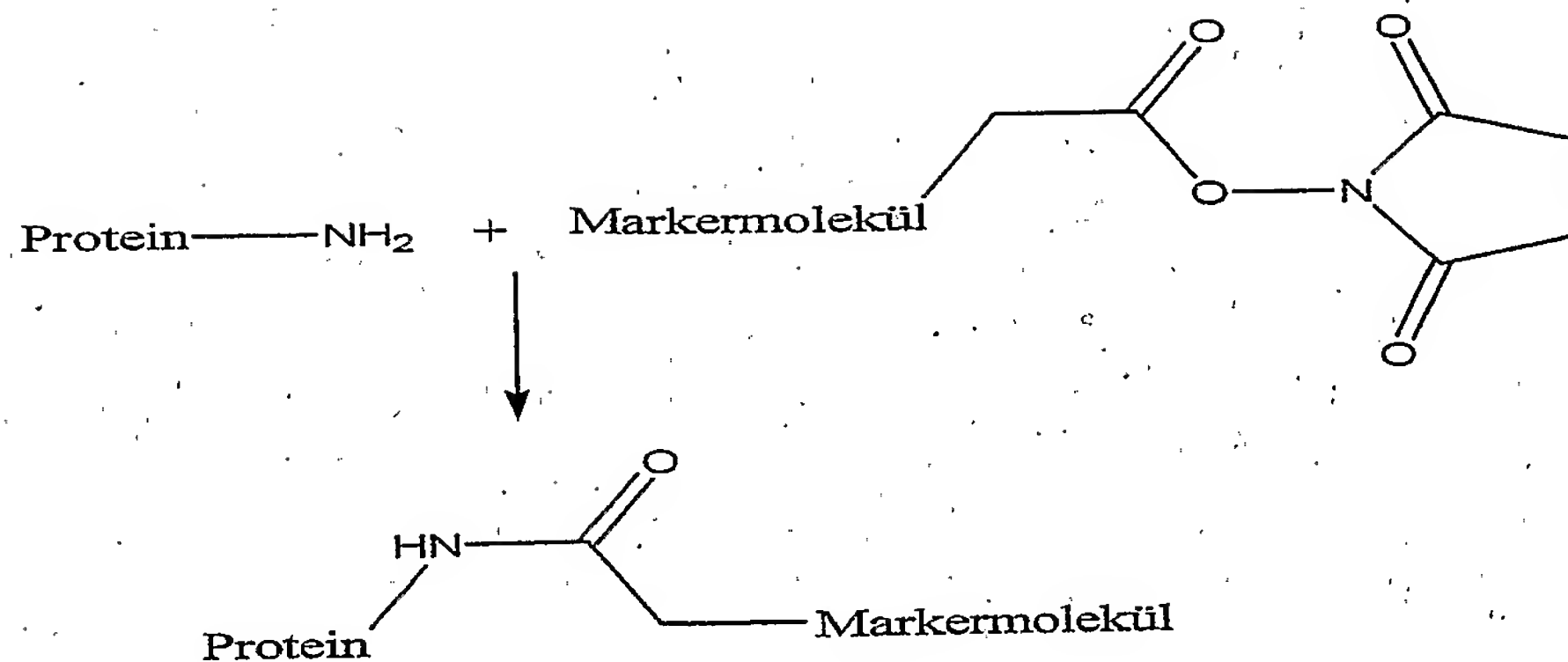
10 Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur effizienten Markierung von Proteinen mit Hilfe eines Mikromischers. Die Markierungsreaktion im Mikromischer ist herkömmlichen Methoden zur Markierung von Proteinen überlegen.

Es ist bekannt, dass Proteine für eine empfindliche und spezifische Detektion
15 häufig mit Markermolekülen versehen werden müssen. Diese Markermoleküle können Farbstoffe, elektrochemisch aktive Verbindungen oder auch selbst Proteine sein, wie die Peroxidase oder das Green Fluorescent Protein (GFP). Derartige Markierungen werden z.B. beschrieben von M. Brinkley in Bioconjugate Chemistry 1992, 3, 2-13 und von R.P. Haugland in Methods in Molecular Biology
20 gy 1995, 45, 205-221.

Eine Möglichkeit für die Markierung ist die Umsetzung eines Proteins, das zum Zwecke einer spezifischen Markierung auch in einer abgewandelten Form vorliegen kann, mit einer aktivierten Form des Markermoleküls. Typischerweise
25 werden am Protein vorhandene Amino- oder Sulfhydrylgruppen markiert.

Für die Markierung von Aminogruppen, zum Beispiel der in einem Protein vorhandenen ϵ -Aminogruppen der Aminosäure Lysin, wird ein Markermolekül mit einer entsprechenden aktivierten Funktionalität versehen. Diese Funktionalität
30 kann beispielsweise ein Isothiocyanat (ITC) oder eine durch eine N-Hydroxysuccinimidgruppe (NHS) oder eine Tetrafluorphenylgruppe (TFP) aktivierte Carbonsäurefunktion am Markermolekül sein. Ein NHS-Ester reagiert dann beispielsweise mit einer primären Aminogruppe zum entsprechenden Amid gemäß folgender Reaktion:

35



5

Für die Aktivierung von Sulfhydrylgruppen werden entsprechende Maleimide eingesetzt.

10

Für die Markierung von Proteinen geeignete aktivierte Derivate von Fluoreszenzmarkern werden von verschiedenen Herstellern in einer großen Zahl angeboten. Vergleicht man die für die Markierung von Proteinen angegebenen Vorschriften, so ist eine weitgehende Übereinstimmung zwischen den verschiedenen Vorschriften festzustellen: Das Protein wird in einem aminfreien Puffer (pH 7 bis 9) in einer Konzentration von etwa 10 mg/ml gelöst. Zur Verbesserung der Löslichkeit können noch 5% Dimethylsulfoxyd (DMSO) zugegeben werden. Dann werden zwischen 2 und 10 molare Äquivalente eines Fluoreszenzmarkers, gelöst in DMSO, zugesetzt und die Reaktion bei Raumtemperatur 5 Minuten bis 2 Stunden gerührt. Anschließend wird die Reaktion durch Zugabe einer Hydroxylaminlösung oder durch das Abtrennen des freien Fluoreszenzmarkers, zum Beispiel durch Gelpermeationschromatographie, gestoppt.

20

Bei der bisher üblichen Markierung von Proteinen z.B. mit Farbstoffen oder Fluoreszenzmarkern kann es jedoch zu Problemen kommen, weil sich nach der Reaktion mit dem Protein gelegentlich ein unlöslicher Niederschlag bildet. Dieser Niederschlag ist auf ein Übermarkieren von Proteinmolekülen mit dem Marker zurückzuführen. Die übermarkierten Moleküle können nicht für die weitere Anwendung eingesetzt werden und gehen somit verloren.

25

Ebenso kann es bei einer unregelmäßigen Markierung der Proteine zu einer sehr starken Markierung einzelner Moleküle kommen. Dies führt zu einem

30

- 5 Selbstquenching der Fluoreszenz in diesen Molekülen und somit zu einer geringeren Fluoreszenzintensität der gesamten Probe.

Es stellte sich deshalb die Aufgabe ein Verfahren zu finden, bei dem nach Möglichkeit jedes Proteinmolekül mit genau der gewünschten Anzahl von Markermolekülen reagiert. Das Protein und das Markermolekül müssen also in vorher festgelegten Mengenverhältnissen in möglichst kleinen Volumenkompartimenten schnell miteinander vermischt werden. Anschließend muss gewährleistet sein, dass die Moleküle ausreichend lange Zeit in Kontakt sind, um miteinander zu reagieren. Nach dieser Zeit wird die Reaktion abgebrochen, um Nebenreaktionen zu vermeiden.

10
15

Es wurde nun ein Verfahren zur Markierung eines freien Amino- und/oder Thiolgruppen tragenden Proteins durch eine damit unter Ausbildung einer kovalenten Bindung reagierende Markerverbindung gefunden, bei dem Lösungen beider Verbindungen in definierten Mengenströmen einem Mikromischer zugeführt und dort intensiv vermischt werden. Anschließend wird die Reaktionsmischung in eine Verweilstruktur eingespeist, wo sie eine durch das Volumen der Verweilstruktur und die Fließgeschwindigkeit der Reaktionsmischung vorbestimmte Zeit verbleibt. Nach einer durch die Reaktionsbedingungen vorgegebenen Zeit kann die Reaktion abgebrochen werden.

20
25

Erfindungsgemäß wird durch den Einsatz von Mikromischern und Verweilstrukturen die Effizienz der Markierungsreaktion aufgrund der besseren Durchmischung und Dosierung der Reaktanden und dem sehr genau einstellbaren und engen Verweilspektrum gegenüber allen bisher bekannten Methoden erheblich gesteigert.

30

Für das erfindungsgemäße Verfahren wird vorzugsweise ein totvolumenarmer Mikromischer eingesetzt, damit nur geringe Substanzmengen für die Markierungsreaktion eingesetzt werden müssen. Besonders geeignet ist ein aus PEEK (Polyetheretherketon) hergestellter Mikromischer. Bei ihm wurden die Kapillareingänge der Zuleitungen unmittelbar gegenüber den Öffnungen der Mikro-

35

- 5 struktur angebracht, so dass dadurch das Totvolumen weiter minimiert werden konnte.

In einen derartigen Mikromischer werden die Protein- und die Markermoleküllösungen mittels präzisen und pulsationsarmen Pumpen (Spritzenpumpen) zu
10 dosiert. Hierfür kann ein Multilaminationsmischer eingesetzt werden, bei dem kleine Teilströme der Lösungen in Form von Lamellen oder dünnen Filmen in kleinen Mischvolumina vereinigt werden. Ebenfalls geeignet ist ein Kaskadenmischer, in dem die Lösungsströme in kleinere Ströme aufgeteilt und diese kleinen Ströme wiederholt zusammengeführt und aufgeteilt werden. Anschließend
15 wird die so vermischte Reaktionslösung in eine Verweilstruktur mit vorgegebener Verweilzeit eingespeist.

Es können unterschiedliche Verweilstrukturen eingesetzt werden, die sich jeweils durch eine möglichst enge Verweilzeitverteilung auszeichnen und geringe
20 Totvolumina aufweisen. Im einfachsten Fall besteht die Verweilstruktur aus einer Kapillare vorgegebener Länge, aber auch andere gleichmäßig durchströmte Volumina oder Anordnungen können eingesetzt werden. Ebenfalls können Verweilstrukturen eingesetzt werden, bei denen das Gemisch im Kreislauf umgepumpt wird, wobei ggf. ein Mikromischer in den Kreislauf eingefügt ist.
25 Letzteres vor allem, wenn zwei Phasen und Phasentrennung vorliegen.

Nach dem Durchlaufen der Verweilstruktur wird die Reaktionslösung aufgefangen. Dabei kann die Reaktion durch Zudosieren eines weiteren Reagenzes mittels eines weiteren Mikromischers, durch thermische Behandlung mit einem
30 Mikrowärmetauscher oder durch Eintropfen der Reaktionsmischung in ein Auffanggefäß mit einem entsprechenden Abbruchreagenz gestoppt werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren führt zu höheren Ausbeuten und zu einer verbesserten Probenqualität, da eine schnelle und gründliche Vermischung der
35 beiden Reaktionspartner im Mikromischer stattfindet und die Verweilzeit in der Verweilstruktur sehr genau eingestellt werden kann.

- 5 Die Erfindung wird durch die beiliegenden Abbildungen und die folgenden Beispiele näher erläutert.

Es zeigen:

- 10 Fig. 1 die Explosionszeichnung eines totvolumenarmen Mikromischers,
Fig. 2 den schematischen Versuchsaufbau mit dem Mikromischer,
Fig. 3 die vollständige Versuchsanordnung.

15

Beispiel 1

- Es sollten Anti-human IgG Antikörper (aus der Ziege) mit Fluoresceiniso-thiocyanat (FITC) markiert werden. Die Antikörper (Lieferant: Sigma, Saint Louis)
20 wurden in 0,1 M Natriumhydrogencarbonatpuffer (pH 8,5) gelöst (10 mg/ml). 10 mg FITC (Lieferant: Molecular Probes, Eugene) wurden in 1 ml DMSO gelöst. Zudem wurde zum Abstoppen der Reaktion eine 1,5 m Hydroxylaminlösung (pH 8,4) hergestellt.

- 25 Es wurde die herkömmliche Markierungsmethode, wie sie in der mitgelieferten Beschreibung des Fluoreszenzmarkers angegeben ist, mit der erfindungsgemäßen Markierung im Mikromischer verglichen.

A1 und A2 – Herkömmliches Markierungsverfahren

30

- Es wurden 2 Ansätze von je 75 µl Antikörperlösung in zwei 1,5 ml Reaktionsgefäße gegeben. Zu einem Ansatz (A1) wurden 37,5 µl der Farbstofflösung, zum anderen (A2) 10 µl gegeben. Es wurde 1 h bei Raumtemperatur kräftig geschüttelt. Anschließend wurden jeweils 100 µl der Hydroxylaminlösung zugegeben
35 und erneut bei Raumtemperatur 20 min geschüttelt. Danach wurde der freie Farbstoff mittels Gelpermeationschromatographie (PD-10 Säulen, Lieferant: Amersham, Laufmittel: Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS)) abgetrennt.

5

Die so gereinigten Antikörperlösungen wurden UV/Vis-spektroskopisch untersucht.

B - Erfindungsgemäßes Markierungsverfahren

10

Die beiden in Abb. 2 gezeigten Spritzen (1, 2) wurden über Kapillaren mit einem Mikromischer (3) verbunden. Zusätzlich wurde eine in Abb. 3 gezeigte Spülleitung an der Kapillare einer der Spritzen angebracht, die zunächst mit einer Klemme verschlossen wurde. Diese Spülleitung wurde an eine HPLC-Pumpe angeschlossen, die mit Wasser (bidestilliert) versorgt wurde. Der Mikromischer (3) war wiederum mit einer Kapillare (4) mit einer Länge von 28 cm verbunden. Am Ende der Kapillare wurde ein Auffanggefäß (5) bereitgestellt, in dem die Reaktionslösung gesammelt wurde.

15

20 Das erfindungsgemäße Markierungsverfahren wurde nun in folgender Weise durchgeführt:

Die Antikörperlösung und die Farbstofflösung wurden jeweils in einer 1 ml Spritze aufgezogen und in jeweils eine der Spritzepumpen (6) und (7) eingespannt.

25

Ansatz B1:

Es wurden 75 µl Proteinlösung (Flussrate: 150 µl/min) und 37,5 µl (Flussrate: 75 µl/min) Farbstofflösung innerhalb von 30 Sekunden in den Mischer dosiert.

30

Anschließend wurde die Klammer der Spülleitung geöffnet und mittels einer HPLC-Pumpe mit einem Fluss von 0,2 µl/min die noch in der Kapillare befindliche Lösung herausgedrückt. Das Auffanggefäß (5) wurde verschlossen und eine Stunde lang bei Raumtemperatur geschüttelt.

35

5 Ansatz B2:

Es wurden 75 µl Proteinlösung (Flussrate: 150 µl/min) und 10 µl (Flussrate: 20 µl/min) Farbstofflösung innerhalb von 30 Sekunden in den Mischer dosiert. Der Ansatz wurde wie in B1 beschrieben weiter behandelt.

10

Die beiden Ansätze der B-Reihe wurden nach einstündigem Schütteln mit jeweils 100 µl einer Hydroxylaminlösung versetzt und erneut bei Raumtemperatur 20 min geschüttelt. Anschließend wird der freie Farbstoff mittels Gelpermeationschromatographie (PD-10 Säulen, Lieferant: Amersham, Laufmittel PBS) abgetrennt.

15

Die so gereinigten Antikörperlösungen wurden UV/Vis-spektroskopisch untersucht.

20

Bei allen vier Ansätzen wurden aus den eingesetzten 0,75 mg Antikörpern nach der Aufreinigung der Reaktionen zwischen 0,6 und 0,7 mg markierte Antikörper erhalten. Die Markierungsgrade (Moleküle Farbstoff pro Molekülprotein) sind für A1: 8,62, für A2: 6,32, für B1: 4,91 und für B2: 2,30.

25

Die markierten Antikörper wurden auf ihre Eignung zur Anfärbung von Granulozyten getestet.

30

Dabei zeigte sich, dass die Proben der A-Reihe einen sehr hohen Hintergrund aufwiesen. Die Proben der B-Reihe zeigten einen geringen Hintergrund. Der Zellkern und die Mitosespindeln waren, wie erwartet, sehr gut sichtbar.

Durch den Einsatz des Mikromischers konnte also eine deutlich verbesserte Probenqualität erhalten werden. Dies ist auf eine gleichmäßigere Markierung der Antikörper zurückzuführen.

35

5 Beispiel 2

In der in diesem Beispiel gezeigten Reaktion wird ein Protein mit einem Fluoreszenzmarker versehen. Dabei wurde der NHS-Ester des Fluoreszenzmarkers eingesetzt, um unspezifisch mit den ϵ -Aminogruppen der im Protein vorhandenen Aminosäure Lysin zu reagieren.

0,27 μ M Protein wurden in 1.800 μ l NaHCO₃-Puffer (0,1 M, pH 8) gelöst. Zur besseren Lösung wurden 100 μ l DMSO zugegeben. 1,08 μ M Farbstoff-NHS-Ester wurden in 140 μ l DMSO gelöst. In den Mikromischer wurden über 1/16"-Kapillaren die Protein- und die Farbstofflösungen mittels Spritzenpumpen zudosiert. Der Gesamtfluss betrug 400 μ l/min.

Am Ausgang des Mischers befand sich eine Kapillare, die so lang war, dass die Verweilzeit der Reaktionslösungen im System 5 Minuten betrug. Anschließend tropfte die Lösung in ein Auffanggefäß (5), das mit der Stopplösung (Hydroxylaminlösung) gefüllt war. Nachdem die entsprechenden Mengen Protein bzw. Farbstofflösung zudosiert waren, musste das zuletzt zudosierte Volumen noch 5 min durch die Verweilkapillare gedrückt werden. Dies geschah mit Hilfe einer HPLC-Pumpe, die mit einem Fluss von 400 μ l/min Wasser durch die Kapillare pumpte.

Nach dem Reaktionsende wurde der in der Stopp-Lösung aufgefangene Markierungsansatz noch 15 Minuten gerührt und anschließend in einer Tischzentrifuge (Modell 5804 R von der Firma Eppendorf) bei Raumtemperatur und 13.200 rpm zentrifugiert, um unlösliche Bestandteile abzutrennen. Bei dieser Reaktion waren jedoch kaum unlösliche Bestandteile zu beobachten.

Der Ansatz wurde mit einer Pipette auf PD-10 Säulen (Lieferant: Amersham) aufgetragen. Das Eluat wurde in Gefriertrocknungsgläschen aufgefangen, eingefroren und anschließend lyophilisiert.

- 5 In Bezug auf die eingesetzte Menge Protein wurde eine Ausbeute von 86,6% mit einem Markierungsgrad von 2,9 erzielt. Mit der von den Herstellern empfohlenen Standardmethode wurden lediglich 45% Ausbeute mit einem Markierungsgrad von 2,7 erzielt.
- 10 Zudem zeigte die im Mikromischer hergestellte Probe gegenüber der herkömmlich hergestellten Probe eine leicht verbesserte Aktivität im anschließenden Aktivitätstest.

15 **Bezugszeichenliste:**

- 1 Spritze 1
2 Spritze 2
3 Mikromischer
20 4 Verweilstruktur
5 Auffanggefäß
6 Spritzenpumpe 1
7 Spritzenpumpe 2

5 Patentansprüche:

- 10 1. Verfahren zur Markierung eines freie Amino- und/oder Thiolgruppen tra-
genden Proteins durch eine damit unter Ausbildung einer kovalenten Bindung
reagierende Markerverbindung, **dadurch gekennzeichnet**, dass Lösungen
beider Verbindungen in definierten Mengenströmen einem Mikromischer zuge-
führt und dort intensiv vermischt werden, anschließend die Reaktionsmischung
15 in eine Verweilstruktur eingespeist wird, dort eine durch das Volumen der Ver-
weilstruktur und die Fließgeschwindigkeit der Reaktionsmischung vorbestimmte
Zeit verbleibt und die Reaktion nach einer durch die Reaktionsbedingungen
vorgegebenen Zeit abgebrochen werden kann.
- 20 2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass als Mar-
kerverbindung ein Farbstoffmolekül eingesetzt wird, das eine reaktive Gruppe
trägt, die mit den freien Amino- und/oder Thiolgruppen des Proteins unter Bil-
dung kovalenter Bindungen reagiert.
- 25 3. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass als Mar-
kerverbindung ein weiteres Protein eingesetzt wird, das eine reaktive Gruppe
trägt, die mit den freien Amino- und/oder Thiolgruppen des Proteins unter Bil-
dung kovalenter Bindungen reagiert und eine chemische Reaktion katalysiert,
die zu einer leicht detektierbaren Farbänderung oder Änderung des Redoxpo-
30 tentials seines Substrates führt.
4. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**,
dass ein totvolumenarmer Mikromischer eingesetzt wird.
- 35 5. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet**,
dass eine Verweilstruktur eingesetzt wird, die ein ausreichendes Volumen auf-

- 5 weist, um bei eingestellter Fließgeschwindigkeit eine ausreichende Verweilzeit der Reaktionsmischung zu gewährleisten.
6. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 5, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Reaktion nach Verlassen der Verweilstruktur durch Zugabe einer Verbindung abgebrochen wird, die mit den noch nicht umgesetzten Markermolekülen schnell reagiert.
- 10 7. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 5, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Reaktion nach Verlassen der Verweilstruktur durch chromatographisches Abtrennen der noch nicht umgesetzten Markermoleküle abgebrochen wird.
- 15 8. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 5, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Reaktion nach Verlassen der Verweilstruktur durch eine thermische Behandlung der Reaktionslösung abgebrochen wird.
- 20 9. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 8, **dadurch gekennzeichnet**, dass ein Mikromischer mit Kanalweiten von kleiner als 100 µm eingesetzt wird.
- 25 10. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 9, **dadurch gekennzeichnet**, dass es sich bei dem eingesetzten Mikromischer um einen Multilaminationsmischer oder um einen Kaskadenmischer handelt.
- 30 11. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 10, **dadurch gekennzeichnet**, dass es sich bei der eingesetzten Verweilstruktur um eine Kapillare vorgegebenen Volumens oder ein anderes gleichmäßig durchströmtes Volumen oder eine gleichmäßig durchströmte Anordnungen handelt.
- 35 12. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 11, **dadurch gekennzeichnet**, dass bei der eingesetzten Verweilstruktur das Gemisch im Kreislauf umgepumpt wird, wobei ggf. ein Mikromischer in den Kreislauf eingefügt ist.

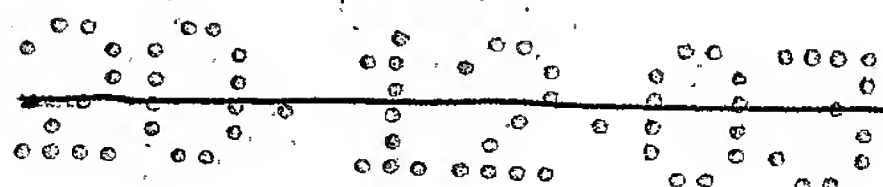


Fig. 1

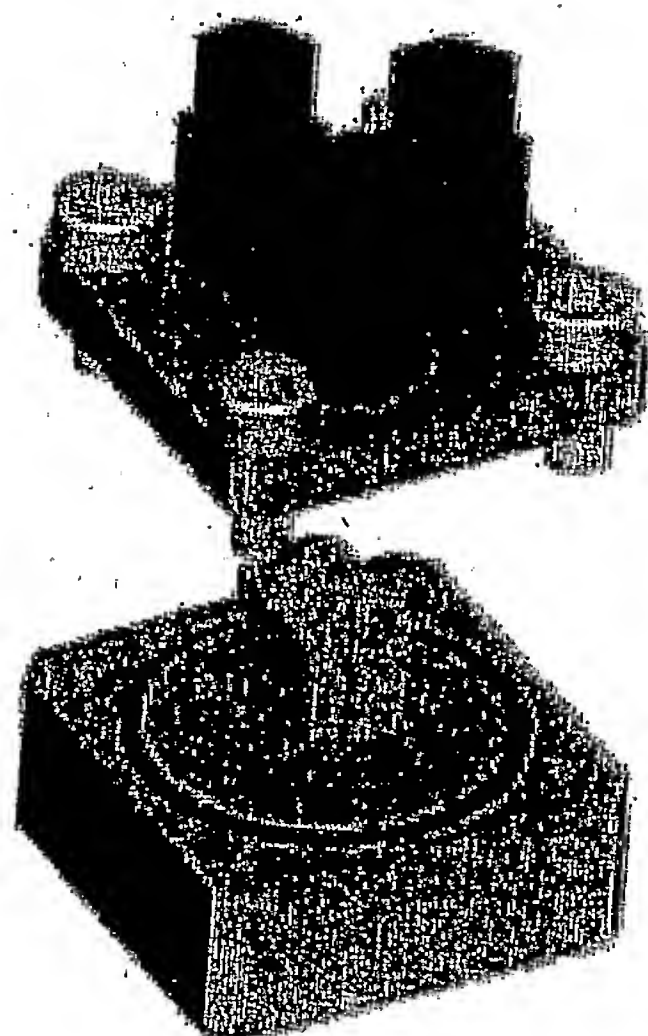
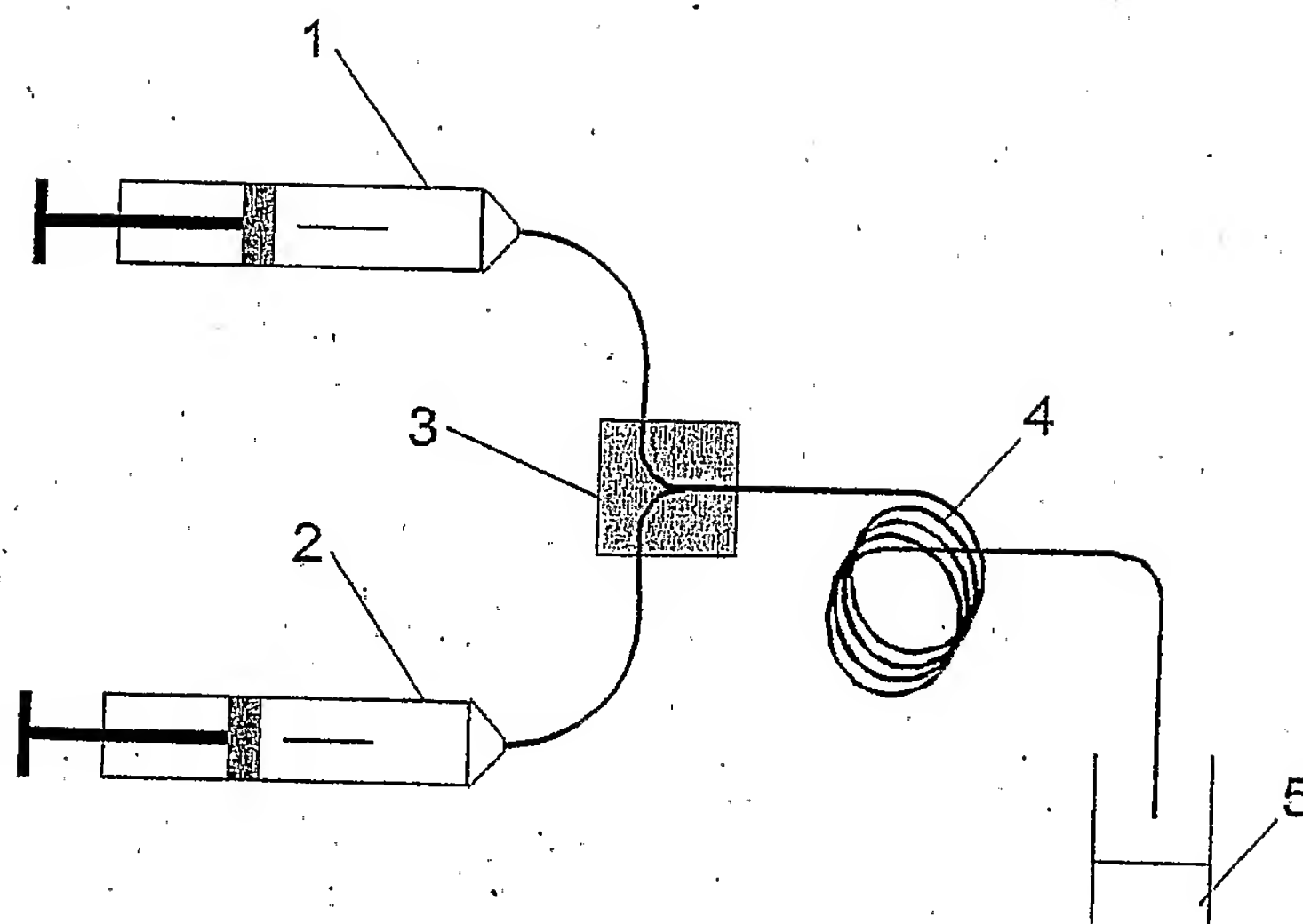


Fig. 2



20.10.03

Fig. 3

